

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 0 856 735 A1

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(43) Date de publication:
05.08.1998 Bulletin 1998/32

(51) Int Cl.⁶: **G01N 33/80, G01N 1/30**

(21) Numéro de dépôt: **98400041.4**

(22) Date de dépôt: **12.01.1998**

(84) Etats contractants désignés:
**AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE**
Etats d'extension désignés:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorité: **31.01.1997 FR 9701090**

(71) Demandeur: **ABX**
34184 Montpellier Cedex 4 (FR)

(72) Inventeur: **Veriac, Sylvie,**
Les Jardins de l'Alhambra
34070 Montpellier (FR)

(74) Mandataire: **Bezault, Jean**
Cabinet Netter
40, rue Vignon
75009 Paris (FR)

(54) **Réactif de coloration pour la détermination de cellules sanguines**

(57) L'invention concerne un réactif de coloration pour la détermination de cellules sanguines, en particulier de réticulocytes, qui comprend un colorant propre à

marquer les cellules après incubation ainsi qu'un additif propre à favoriser la pénétration du colorant dans les cellules, cet additif étant choisi parmi un composé ionophore, un détergent et leur mélange.

EP 0 856 735 A1

Description

L'invention concerne les analyses biologiques et notamment les analyses de sang.

Elle concerne plus particulièrement un réactif de coloration pour la détermination de cellules sanguines, en particulier de réticulocytes, du type comprenant un colorant propre à marquer les cellules après incubation.

On connaît déjà différents réactifs de coloration de ce genre qui permettent d'identifier et de caractériser des cellules sanguines grâce à un colorant qui permet de marquer ou colorer les cellules après incubation dans des conditions de durée et de température choisies.

De tels réactifs font généralement appel à un colorant fluorescent ou à un colorant non-fluorescent qui, après incubation, permet le comptage des cellules colorées. Ce comptage peut être réalisé avec une coloration manuelle au microscope, avec une coloration extérieure ou avec une coloration par un appareil automatisé.

Le comptage automatisé s'effectue généralement par une technique dite de cytométrie de flux qui s'avère plus fiable et plus rapide qu'un comptage manuel.

On connaît déjà différents colorants utilisés pour la détermination de cellules sanguines, en particulier de réticulocytes, et qui peuvent être utilisés pour un comptage manuel ou automatisé.

Parmi ces colorants fluorescents ou non-fluorescents, on peut citer notamment la pyronine Y, l'acridine orange, la thioflavine T, le thiazole orange, le nouveau bleu de méthylène ("new methylene blue"), le bleu crésyl brillant ("brilliant cresyl blue"), etc.

Des exemples de réactifs à coloration sont décrits notamment dans les publications de Brevets suivantes : CA 2 024 166, US 5 501 954, US 4 325 706, US 5 438 003, US 5 075 556, US 4 996 040, US 4 883 867, EP 0 545 314, EP 0 545 315, EP 0 430 719, EP 0 215 461, EP 0 226 272 et EP 0 114 462.

Dans le cas particulier de la détermination des réticulocytes, lesquels sont des précurseurs des érythrocytes ou globules rouges matures, le colorant sert à colorer ou marquer l'ARN résiduel contenu dans la cellule.

L'un des inconvénients des réactifs de coloration connus est qu'ils nécessitent un temps d'incubation élevé, ce qui rend difficile leur utilisation non seulement dans les techniques manuelles, mais surtout dans les techniques automatisées.

En particulier, le thiazole orange nécessite un temps d'incubation de l'ordre de 30 minutes à la température ambiante lorsqu'il est mis à réagir avec 5 microlitres de sang.

Ce temps d'incubation est beaucoup trop long pour permettre une automatisation complète du procédé.

L'invention a notamment pour but de surmonter les inconvénients précités.

C'est en particulier un but de l'invention de procurer un réactif de coloration pour la détermination de cellules

sanguines, en particulier de réticulocytes, qui permet de marquer les cellules après un temps d'incubation beaucoup plus court que les temps d'incubation autorisés par les réactifs connus.

C'est en particulier un but de l'invention de procurer un tel réactif de coloration qui permet d'abaisser le temps d'incubation de plusieurs minutes à plusieurs secondes.

L'invention propose à cet effet un réactif de coloration du type défini en introduction, lequel comprend en outre un additif propre à favoriser la pénétration du colorant dans la cellule, cet additif étant choisi parmi un composé ionophore, un détergent et leurs mélanges.

Ainsi, le réactif de coloration de l'invention combine un colorant à un additif particulier qui favorise l'incorporation du colorant dans la cellule et, par conséquent, diminue notablement le temps d'incubation nécessaire à la réaction du colorant avec la cellule.

Dans le cadre de l'invention, on préfère avant tout utiliser un composé ionophore, c'est-à-dire un composé susceptible de favoriser la perméabilité de la membrane cellulaire et d'amplifier les échanges trans-membranaires.

Ces ionophores sont des molécules à caractère hydrophobe qui augmentent la perméabilité de la membrane cellulaire à certains ions avec une spécificité variable.

Ces ionophores sont soit des transporteurs mobiles, soit des molécules formant des canaux trans-membranaires. Ils masquent la charge de l'ion du colorant, facilitant sa pénétration dans la bi-couche lipidique de la membrane.

L'additif de l'invention peut être également choisi parmi un détergent, lequel favorise aussi la pénétration du colorant en favorisant la perméabilité de la membrane. Le détergent désorganise les structures protéiques de la membrane et favorise sa déstabilisation, ce qui contribue à une meilleure incorporation du colorant.

L'additif de l'invention peut, en variante, être un mélange d'un composé ionophore et d'un détergent.

Le composé ionophore de l'invention peut être notamment un protonophore ou un antibiotique.

Des exemples non limitatifs de composés ionophores convenant à la mise en oeuvre de l'invention sont les suivants :

- Monensine, ou acide 2-[5-éthyltétrahydro-5-[tétrahydro-3-méthyl-5-[tétrahydro-6-hydroxy-6-(hydroxyméthyl)-3,5-diméthyl-2H-pyran-2-yl]-2-furyl]-2-furyl]-9-hydroxy-β-méthoxy-α,γ,2,8-tétraméthyl-1,6-dioxaspiro[4,5]décane-7-butyrrique (polyéther antibiotique de formule brute : $C_{36}H_{62}O_{11}$);
- Nonactine, ou 2,5,11,14,20,23,29,32-octaméthyl-4,13,22,31,37,38,39,40-octaoxapentacyclo[32.2.1.17.10.116.19.125.28]-tétracontane-3,12,21,30-tétrone (macrotétrolide antibiotique de formule brute : $C_{40}H_{64}O_{12}$);

- 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy-benzylidènemalononitrile;
- Carbonylcyanide m-chlorophénylhydrazone;
- Carbonylcyanide p-trifluorométhoxyphénylhydrazone;
- Tétrachlorosalicylanilide;
- 4,5,6,7-tétrachloro-2-trifluorométhylbenzimidazole;
- Pentachlorophénol;
- 2,4-dinitrophénol;
- Valinomycine (cyclododécapeptide, antibiotique de formule : $C_{54}H_{90}N_6O_{18}$);
- Salinomycine (polyéther antibiotique de formule : $C_{42}H_{70}O_{11}$);
- Gramicidine(S) (polypeptide de formule : $C_{60}H_{92}N_{12}O_{10}$).

Le détergent pouvant être utilisé dans le réactif de coloration de l'invention est de préférence du type non-ionique ou de type zwitterionique.

A titre d'exemples non limitatifs de détergents convenant à la mise en oeuvre de l'invention, on peut mentionner :

- des propane sulfonates, en particulier le 3-[(3-cholamido-propyl)-diméthylammonio]-1-propane-sulfonate;
- des cholamides, en particulier le N,N-bis[3-D-glucosamido-propyl]-cholamide;
- des sulfobétaïnes;
- des alkyl glucosides et alkyl maltosides;
- des polyoxyéthylène éthers;
- des polyoxyéthylène sorbitans;
- des polyglycol éthers.

Le colorant utilisable dans le réactif de coloration de l'invention est un marqueur susceptible de révéler par coloration des composés intracellulaires tels que, par exemple, les acides nucléiques de la cellule, en particulier l'ARN.

Bien que l'on préfère utiliser un colorant fluorescent, et en particulier un colorant fluorescent pour les réticulocytes, il entre également dans le cadre de l'invention

de faire appel à des colorants non fluorescents.

Lorsqu'il s'agit d'un colorant fluorescent, le colorant est avantageusement excitable à une longueur d'onde comprise entre 0,1 nm et 1 nm.

De préférence, il s'agit d'un colorant excitable à la lumière bleue, en particulier à une longueur d'onde de 488 nm.

A titre d'exemples non limitatifs de colorants utilisables dans la mise en oeuvre de l'invention, on peut mentionner :

- le 3,3'-diméthylloxacarbocyanine iodure (ou 3-méthyl-2-[3-(3-méthyl-2 (3H)-benzoxazolylidène)-1-propényl]benzoxazolium iodure);
- le thiazole orange ou 1-méthyl-4-[(3-méthyl-2-(3H)-benzothiazolylidène)méthyl]quinolinium p-tosylate;
- le quinolinium, 4-[(3-méthyl-2-(3H)-benzothiazolylidène)méthyl]-1-[3-(triméthylammonio)propyl], diiodure (commercialisé sous la dénomination TO-PRO 1, Marque déposée par Molecular Probes);
- des styryls, en particulier le styryl 7;
- le nouveau bleu de méthylène;
- le bleu de crésyl brillant.

Lorsque ce colorant connu est combiné à un composé ionophore et/ou à un détergent dans des proportions choisies, il franchit rapidement la membrane de la cellule, ce qui permet de diminuer notablement le temps d'incubation et de l'amener généralement à une valeur de quelques dizaines de secondes.

Ainsi, dans le cas du thiazole orange, le temps d'incubation peut être amené à une valeur de l'ordre de 25 secondes, au lieu de 30 minutes à la température ambiante, lorsque le colorant est utilisé seul.

Le réactif de coloration de l'invention peut comporter d'autres composés ou substances que le colorant et l'additif mentionnés précédemment.

Ainsi, le réactif de coloration peut comprendre en outre un solvant organique, en particulier un alcool tel que le méthanol, ce qui favorise non seulement la mise en solution du colorant, mais aussi la solubilisation des lipides membranaires de la cellule.

En variante ou en complément, le réactif de coloration peut comporter en outre un sel, par exemple à base de sodium, de potassium.

Il a été constaté en effet qu'une concentration en sels induit une force dite "ionique" qui, si elle est suffisamment élevée, peut déstabiliser les membranes cellulaires en modifiant les liaisons des constituants membranaires. De plus, le sel permet d'agir sur le volume des cellules.

D'autres composés pouvant faire partie du réactif de l'invention comprennent un agent chélateur, en par-

ticulier l'EDTA, un conservateur et un système tampon pour maintenir le pH entre 5 et 11.

Le réactif-type de l'invention est une solution de coloration ou de marquage qui contient :

- un colorant à une concentration comprise entre 0,1 μ M et 0,5 M
- au moins un additif choisi ci-dessous

Composés	Concentrations
Ionophore	0-1 M
Détergent	0-20%

- un ou plusieurs des composés énumérés ci-dessous :

Composés	Concentrations
Sels (NaCl/KCl)	0-1 M
Agent chélateur (EDTA)	0-100 mM
Solvant	0-15%
Conservateur	0-1%

- un système tampon organique ou inorganique maintenant le pH entre 5 et 11.

Un exemple de réactif de coloration selon l'invention est le suivant :

Composés	Concentrations
thiazole orange	2 μ M
valinomycine	1 μ M
polyglycoléther	0,0003%
NaCl	155 mM
EDTA	2 mM
méthanol	1,5%

Le système tampon utilisé est un tampon phosphate ajustant le pH de la solution de coloration à valeur neutre.

L'invention sera maintenant expliquée en référence aux dessins annexés qui représente des images obtenues sur un cytomètre de flux et qui comparent à chaque fois l'image obtenue avec un colorant de référence et l'image obtenue avec un réactif de coloration selon l'invention.

Ces images représentent la fluorescence (axe des X) et la diffraction (axe des Y). On retrouve sur chacune de ces figures, de la gauche vers la droite, respectivement, trois populations : la population des globules rouges (apparaissant sous la forme d'un nuage), la population des réticulocytes (partie encadrée) et la popula-

tion des leucocytes (nuage dispersé).

Les figures 1A et 1B représentent les images obtenues sur un cytomètre de flux FACSCAN (Marque déposée de Becton Dickinson) en utilisant le thiazole orange comme colorant.

La figure 1A représente l'image obtenue avec le colorant de référence. Le temps d'incubation requis est de 30 minutes à la température ambiante. Le taux de réticulocytes est de 4,55%.

La figure 1B montre l'image obtenue avec un réactif de coloration selon l'invention, qui comporte du thiazole orange en présence de ionophore. Le temps d'incubation nécessaire n'est que de 25 secondes à 35°C, le taux de réticulocytes étant de 4,89%.

Les figures 2A et 2B sont des images obtenues avec un cytomètre de flux FACSCAN en utilisant un réactif de coloration selon l'invention, qui comporte du 3,3'-diméthylcarbocyanine iodure en tant que colorant, en présence d'un ionophore et d'un détergent.

Les deux colorations sont réalisées à 35°C. On obtient un résultat équivalent à 5 minutes pour le colorant de référence (figure 2A) et à 30 secondes pour le réactif selon l'invention (figure 2B).

Les taux de réticulocytes des images des figures 2A et 2B sont respectivement de 1,5% et de 1,3%.

Les figures 3A et 3B sont des images obtenues sur un cytomètre de flux FACSCAN avec le colorant TO-PRO 1 (Marque déposée de Molecular Probes), sous irradiation à la lumière bleue.

Dans le cas de la figure 3A (colorant de référence), le temps d'incubation est de 60 minutes et le taux de réticulocytes de 2,22.

Dans le cas de la figure 3B (colorant en présence de ionophore), le temps d'incubation est de 5 minutes et le taux de réticulocytes de 2,14%.

Les figures 4A et 4B représentent des images obtenues sur un cytomètre de flux FACSTAR (Marque déposée de Becton Dickinson) avec un colorant du type TO-PRO 3 (Marque déposée de Molecular Probes), sous irradiation à la lumière rouge.

Dans le cas de la figure 4A (colorant de référence), le temps d'incubation est de 30 minutes et le taux de réticulocytes de 4,1%.

Dans le cas de la figure 4B, le temps d'incubation est de 2 minutes et le taux de réticulocytes de 4,9%.

Les images précédentes montrent que l'utilisation d'un réactif de coloration selon l'invention permet de diminuer significativement le temps d'incubation par rapport à l'utilisation d'un colorant de référence.

Revendications

1. Réactif de coloration pour la détermination de cellules sanguines, en particulier de réticulocytes, du type comprenant un colorant propre à marquer les cellules après incubation, caractérisé en ce qu'il comprend en outre un additif

- propre à favoriser la pénétration du colorant dans les cellules, cet additif étant choisi parmi un composé ionophore, un détergent et leurs mélanges.
2. Réactif de coloration selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'additif comprend un composé ionophore. 5
 3. Réactif de coloration selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'additif comprend un détergent. 10
 4. Réactif selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'additif comprend un mélange d'un composé ionophore et d'un détergent. 15
 5. Réactif selon l'une des revendications 1, 2 et 4, caractérisé en ce que le composé ionophore est un protonophore ou un antibiotique choisi parmi :
 - Monensine ou acide 2-[5-éthyltétrahydro-5-[tétrahydro-3-méthyl-5-[tétrahydro-6-hydroxy-6-(hydroxyméthyl)-3,5-diméthyl-2H-pyran-2-yl]-2-furyl]-2-furyl]-9-hydroxy-β-méthoxy-α,y, 2,8-tétraméthyl-1,6-dioxaspiro[4,5]décane-7-butyrique; 20
 - Nonactine ou 2,5,11,14,20,23,29,32-octaméthyl-4, 13, 22, 31, 37, 38, 39, 40 - octaoxapentacyclo[32.2.1.17.10.116.19.125.28]-tétracontane-3,12,21,30-tétrone; 25
 - 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy-benzylidènemalonitrile; 30
 - Carbonylcyanide m-chlorophénylhydrazone; 35
 - Carbonylcyanide p-trifluorométhoxyphénylhydrazone;
 - Tétrachlorosalicylanilide; 40
 - 4,5,6,7-tétrachloro-2-trifluorométhylbenzimidazole;
 - Pentachlorophénol; 45
 - 2,4-dinitrophénol;
 - Valinomycine; 50
 - Salinomycine;
 - Gramicidine(S).
 6. Réactif de coloration selon l'une des revendications 1, 3 et 4, caractérisé en ce que le détergent est du type non-ionique ou zwitterionique et choisi parmi : 55
 - des propane sulfonates, en particulier le 3-[(3-cholamido-propyl)-diméthylammonio]-1-propane-sulfonate;
 - des cholamides, en particulier le N,N-bis[3-D-gluconamido-propyl]-cholamide;
 - des sulfobétaïnes;
 - des alkyl glucosides et alkyl maltosides;
 - des polyoxyéthylène éthers;
 - des polyoxyéthylène sorbitans;
 - des polyglycol éthers.
 7. Réactif de coloration selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le colorant est du type fluorescent.
 8. Réactif de coloration selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le colorant est excitable à une longueur d'onde comprise entre 0,1 nm et 1 mm.
 9. Réactif de coloration selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le colorant est excitable à la lumière bleue, en particulier à une longueur d'onde de 488 nm.
 10. Réactif de coloration selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le colorant est choisi parmi les suivants :
 - le 3,3'-diméthylloxacarbocyanine iodure (ou 3-méthyl-2-[3-(3-méthyl-2(3H)-benzoxazolylidène)-1-propényl]benzoxazolium iodure);
 - le thiazole orange ou l-méthyl-4-[(3-méthyl-2-(3H)-benzothiazolylidène)méthyl]quinolinium p-tosylate;
 - le quinolinium, 4-[(3-méthyl-2-(3H)-benzothiazolylidène)méthyl]-1-[3-(triméthylammonio)propyl], diiodure;
 - des styryls, en particulier le styryl 7;
 - le nouveau bleu de méthylène;
 - le bleu de crésyl brillant.
 11. Réactif de coloration selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins un composé choisi parmi les suivants :
 - un sel, en particulier de sodium ou de potas-

sium,

- un agent chélateur, en particulier l'EDTA,
- un solvant, en particulier un alcool, 5
- un conservateur, et
- un système tampon maintenant le pH entre 5 et 11. 10

12. Réactif de coloration selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé par la composition suivante :

- un colorant à une concentration comprise entre 0,1 μ M et 0,5 M 15
- au moins un additif choisi ci-dessous

20

Composés	Concentrations
Ionophore	0-1 M
Détergent	0-20%

25

- un ou plusieurs des composés énumérés ci-dessous :

Composés	Concentrations
Sels (NaCl/KCl)	0-1 M
Agent chélateur (EDTA)	0-100 mM
Solvant	0-15%
Conservateur	0-1%

30

35

- un système tampon organique ou inorganique maintenant le pH entre 5 et 11.

40

45

50

55

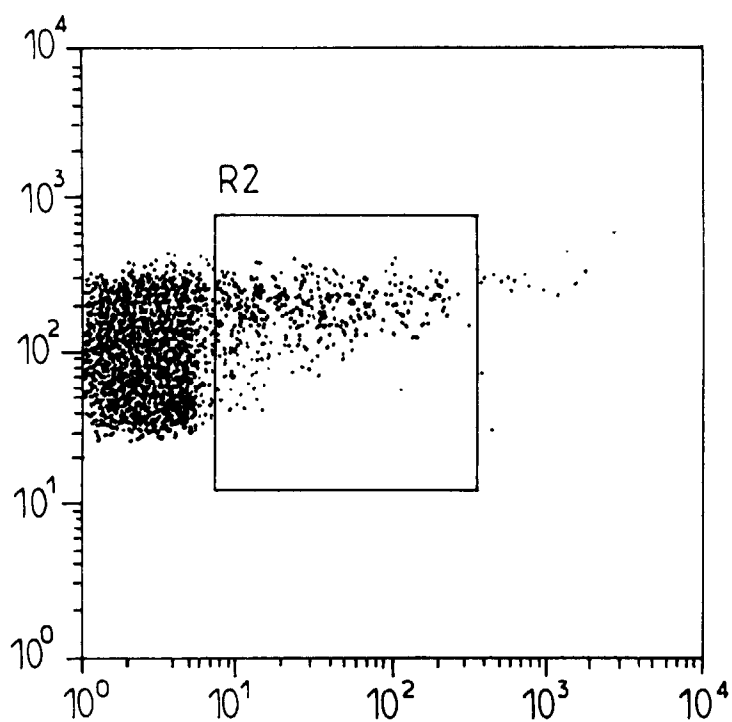


FIG.1A

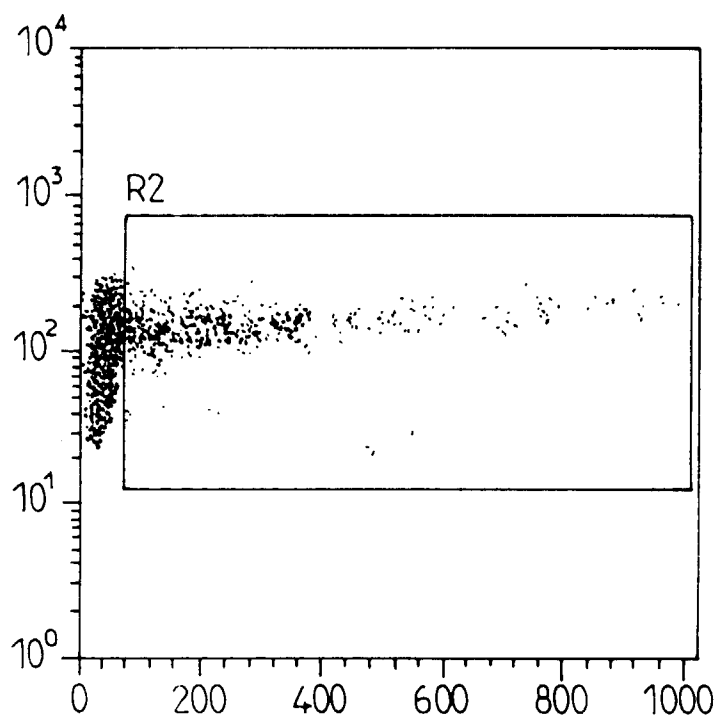


FIG.1B

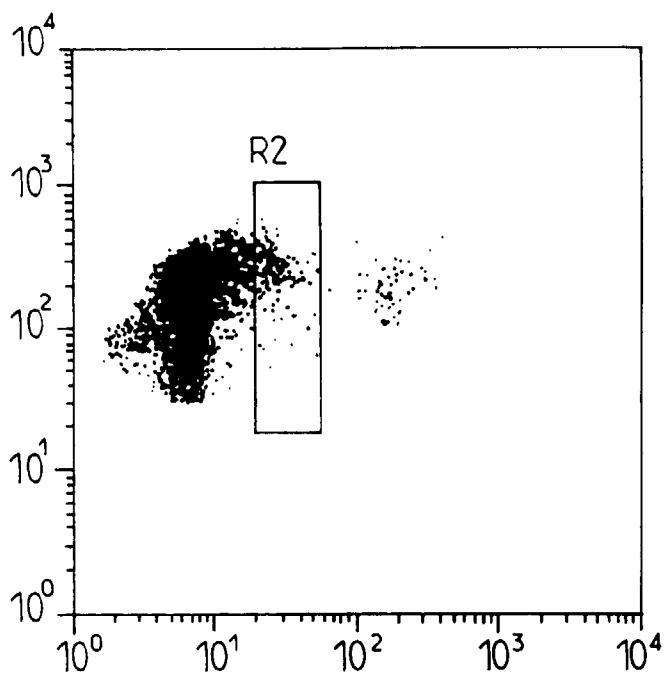


FIG.2A

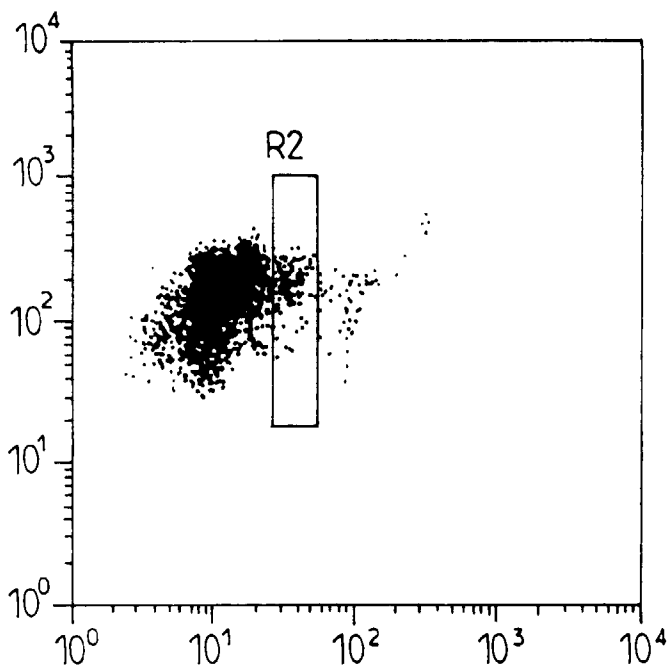


FIG.2B

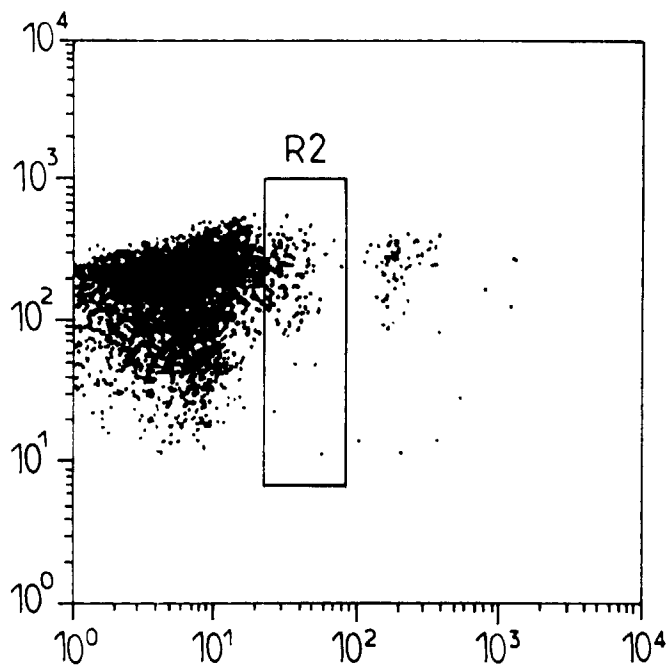


FIG. 3A

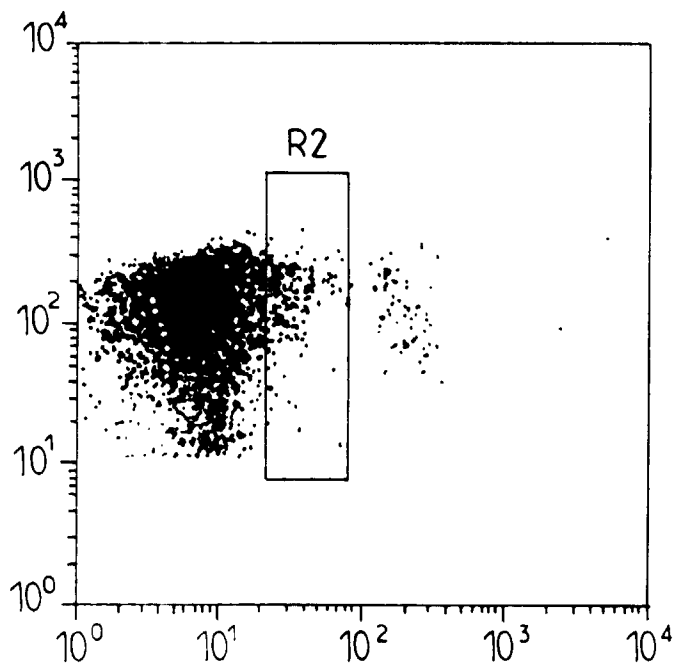


FIG. 3B

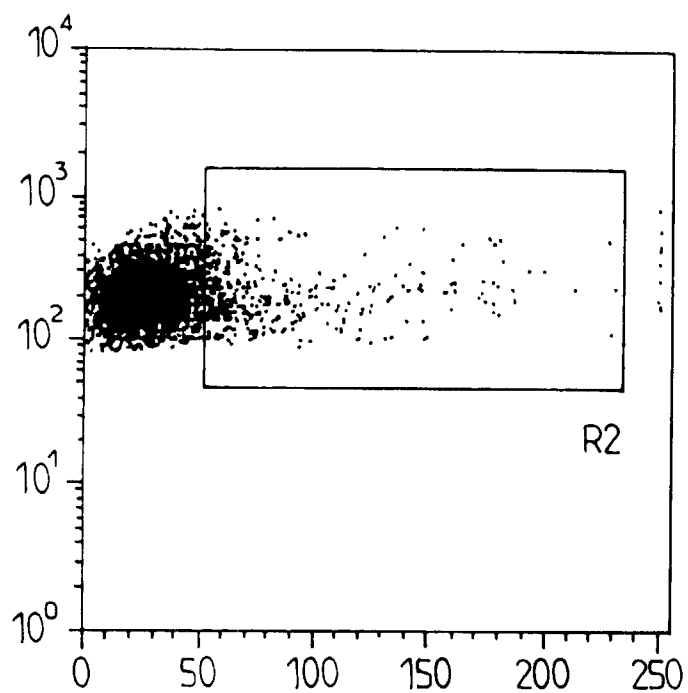


FIG.4A

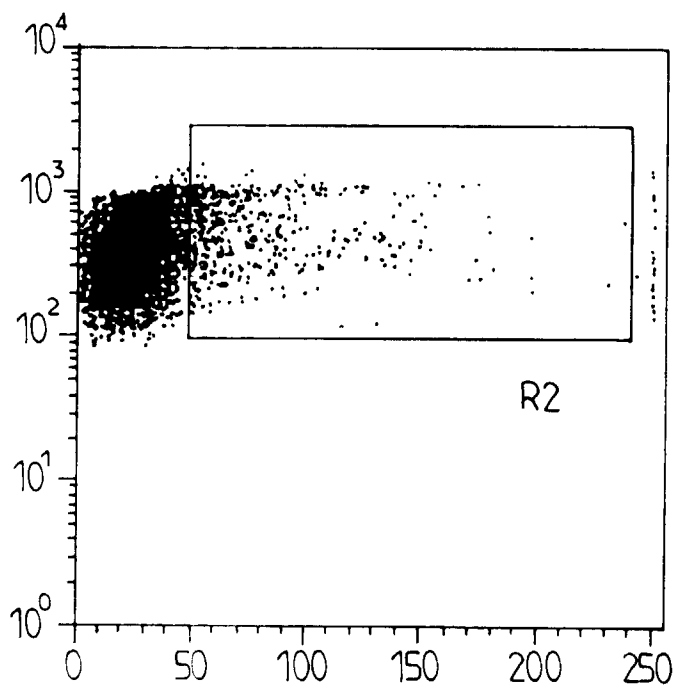


FIG.4B



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande
EP 98 40 0041

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.CI.6)
X	US 4 670 402 A (FLEGLER KARL-HEINZ) * le document en entier * ----	1-4,7	G01N33/80 G01N1/30
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 8622 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 86-142078 XP002044489 & JP 61 079 163 A (TOA IYO DENSHI KK) , 22 avril 1986 * abrégé * ----	1,3	
D,A	EP 0 545 315 A (MILES INC ;SINAI SCHOOL MEDICINE (US)) * le document en entier * ----	1	
D,A	EP 0 430 719 A (TECHNICON INSTR) * le document en entier * ----	1	
D,A	EP 0 226 272 A (BECTON DICKINSON CO) * le document en entier * -----	1	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CI.6)
			G01N
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 23 avril 1998	Examineur Moreno, C
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

EPO FORM 1503 03 82 (P04002)